

**GLUKAGONEFFEKT AUF INSULINBINDUNG UND
INSULINSTIMULATION DES GLUKOSETRANSPORTS
IN ISOLIERTEN RATTENFETTZELLEN**

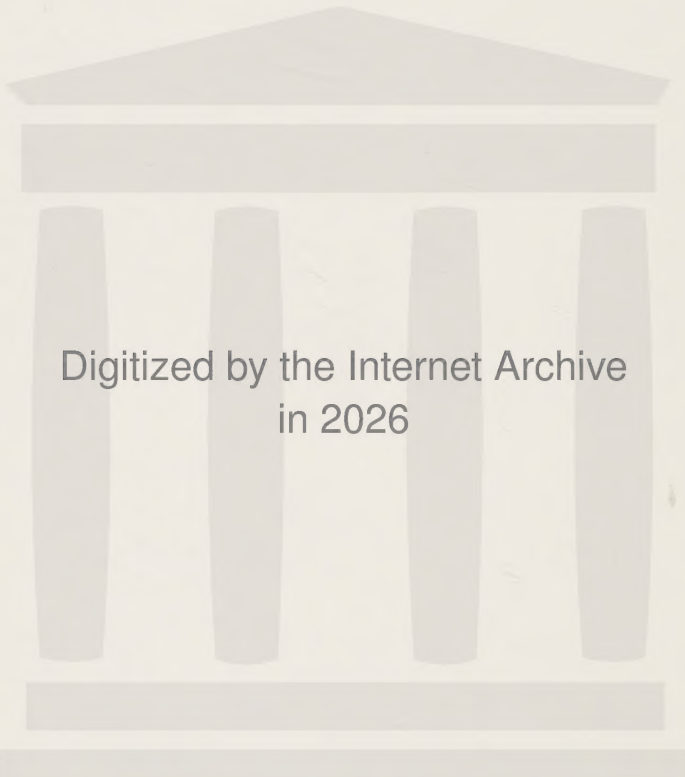
ROBERT THÜRINGER

1987

D_isbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Diabetesforschung München
(Vorstand): Prof. Dr. H. Mehnert

Glukagoneffekt auf Insulinbindung und Insulinstimulation des
Glukosetransports in isolierten Rattenfettzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Robert Thüringer
aus
München
im Jahr 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Mitherichterstatter: 1. Prof. Dr. P. Schwandt
2. Prof. Dr. R. Landgraf

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: 1. Dr. D. Kirsch
2. Dr. H. Häring

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen
Prüfung: 8.10.1987

Gewidmet Dr. D. Kirsch,
dem verstorbenen Betreuer der vorliegenden Arbeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Material und Methoden

- 2.1. Verwendete Chemikalien
- 2.2. Herstellung isolierter Fettzellen
- 2.3. Bestimmung der Insulinbindung
- 2.4. Messung des 3-O-Methyl-Glukosetransports

3. Ergebnisse

- 3.1. Effekt von Glukagon und anderen Peptidhormonen auf die Insulinbindung
- 3.2. Effekt von Glukagon auf die Insulinstimulation des Glukosetransports
- 3.3. Konzentrationsabhängigkeit des Glukagoneffekts auf die Insulinstimulation des Glukosetransports
- 3.4. Zeitabhängigkeit des Glukagoneffekts auf den Glukosetransport
- 3.5. Reversibilität des Glukagoneffekts auf den Glukosetransport
- 3.6. Vergleich der Effekte von Glukagon und Isoproterenol und deren Kombination mit Forskolin auf den Glukosetransport

4. Diskussion

- 4.1. Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse
- 4.2. Cyclo-AMP als Vermittler der Glukagonwirkung
- 4.3. Gibt es eine glukagoninduzierte Insulinresistenz? - Auswirkung erhöhter Glukagonspiegel im stoffwechselgesunden menschlichen Organismus und bei Diabetes mellitus

5. Schlußbemerkung

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Während der Forschungsarbeiten zur Isolierung und Darstellung des Insulins wurde im Jahre 1923 eine Substanz mit blutzuckererhöhender Wirkung entdeckt. Es dauerte weitere 53 Jahre, bis die Struktur des aus den A-Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas stammenden Hormons aufgeschlüsselt wurde. Es handelt sich um Glukagon, ein Polypeptid aus 29 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 3.485 Dalton.

Die Konzentration des Glukagons im menschlichen Blut beträgt 0.05 - 0.1 ng/ml (Sokal, 1967), die Halbwertszeit 4 - 7 Minuten.

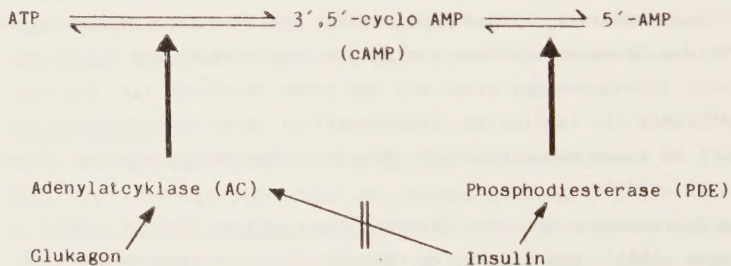
Glukagon wirkt in erster Linie auf den Kohlenhydratstoffwechsel, es beeinflusst aber auch den Eiweiß- und Fettstoffwechsel.

Glukagon stimuliert die Glukoneogenese (Shrago, 1963; Exton, 1966) und den Glykogenabbau in der Leber (Kibler, 1964). Damit trägt allein Glukagon im Nüchternzustand zu etwa zwei Drittel zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels bei (Cherrington, 1979). Im Bedarfsfall, beispielsweise im Rahmen einer Stresssituation, mobilisieren sowohl Adrenalin als auch Glukagon sofort hepatische Glykogenreserven (Liljenquist, 1977). Die Bedeutung des Glukagons für die Glukosehomöostase ist daraus ersichtlich, daß ein angeborener Glukagonmangel nicht mit dem Leben vereinbar ist. Ein Neugeborenes mit isoliertem Glukagondefizit würde bald nach der Geburt an einem hypoglykämisch bedingten Hirnschaden sterben (Vidnes et al., 1977).

Im Fettgewebe stimuliert Glukagon die Lipolyse (Cahill, 1957; Hagen, 1961). Deshalb fallen vermehrt freie Fettsäuren zur Ketogenese an, welche durch die glukagoninduzierte Stimulation der Fettsäureoxidation (McGarry, 1981) weiter unterhalten wird. Dadurch wird in der Fettzelle die von Glukagon verursachte Hemmung der Glukoseoxidation verstärkt (Schwabe et al., 1974).

Glukagon spielt im Stoffwechsel demnach die Rolle eines Insulin-antagonisten, da Insulin den Glykogenaufbau, die Glukoneogenese und die Glukoseoxidation fördert, den Fettsäureabbau und die Ketogenese dagegen hemmt.

Die Glukagonwirkung an den verschiedenen Zielorganen wird durch einen sogenannten "second-messenger"-Mechanismus vermittelt (Sutherland, 1965). Durch die Bindung von Glukagon an spezifischen Rezeptoren der Leber- (Rodbell, 1971; Birnbaumer, 1973), Fett- (Butcher, 1968; Johnson, 1972) und Muskelzelle (Murad, 1969) wird unter Mitwirkung von GTP ein intermediäres Regulatorprotein aktiviert, welches die katalytische Untereinheit der Adenylatcyklase stimuliert (Rodbell, 1978; Johnson, 1979; Rojas 1985). Der daraufhin erfolgende Anstieg des cyclischen 3',5'-AMP aktiviert wiederum über Phosphorylierungsreaktionen (Heyworth & Houslay, 1983a) intrazelluläre Enzymproteine, welche die Weichen für die einzelnen Stoffwechselwege stellen (Sutherland, 1969).



Wie das obige Schema zeigt, beeinflusst Insulin das cAMP-System in gegenläufiger Richtung. Insulin hemmt die Adenylatcyklase (Hepp, 1972; Illiano, 1972; Hollenberg, 1975) und aktiviert gleichzeitig die Phosphodiesterase (Loten, 1978; Hollenberg, 1982; Houslay & Heyworth, 1983). Die Aktivierung der PDE dürfte dabei im Vordergrund der Insulinwirkung stehen, da der Insulineffekt auf den

cAMP-Spiegel durch einen PDE-Hemmer fast vollständig aufhebbar ist (Häring et al., 1976; Heyworth, 1983b). Der molekulare Wirkungsmechanismus für den Glukagon-Insulin-Antagonismus ist experimentell abgesichert. Zum Beispiel setzt Glukagon in Leberzellen die Ansprechbarkeit der PDE auf Insulin herab (Heyworth et al., 1983b), in Fettzellen verhindert Glukagon den insulininduzierten Abfall erhöhter Adenylatcyclaseaktivität (Torres, 1978), wodurch nachweislich die Glukoseoxidation gehemmt wird (Taylor, 1979). Da die Interaktionen zwischen Glukagon und Insulin auf molekularer Ebene nur bruchstückhaft bekannt sind, untersuchten wir zur weiteren Klärung dieser Fragestellung zunächst den Einfluß von Glukagon auf die Insulinbindung, die ja am Anfang der Insulinsignalvermittlung steht. Von allen möglichen Insulinwirkungen, auf die der Einfluß von Glukagon untersucht werden kann, widmeten wir uns sodann der insulininduzierten Stimulation des Glukosetransportes in isolierten Rattenfettzellen. Die Fettzellen der Ratte sind ähnlich denen des Menschen zwar nicht wesentlich an der Glukosehomöostase beteiligt, lassen sich dafür aber einfach isolieren und sind sehr insulinempfindlich (Olefsky 1978).

Insulin stimuliert den Glukosetransport durch eine ATP-abhängige Translokation von Carrier-Proteinen aus der zellulären Subfraktion der Mikrosomen in die Zellmembran (Cushman, 1980; Häring, 1981a, Kono, 1982). Es konnte bereits gezeigt werden, daß von den Insulinantagonisten Katecholamine, das Wachstumshormon und Cortisol (Olefsky et al., 1975) die Stimulation des Glukosetransportes durch Insulin hemmen. Während der STH-Effekt auf den Glukosetransport über die Phosphodiesterase vermittelt wird (Schönle & Zapf, 1981, 1983), wurde in den Katecholaminstudien ein signifikanter Zusammenhang zwischen intrazellulären cAMP-Spiegel und der Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransportes nachgewiesen (Kirsch et al., 1983, 1984; Kashiwagi et al., 1983). Da nun Glukagon gleich den Katecholaminen den cAMP-Spiegeln in Fettzellen erhöht (Butcher 1968, Sonne & Glieman, 1977; Gaben, 1982), ist es naheliegend, daß die Glukagonwirkung auf den insulinstimulierten

Glukosetransport ebenfalls über das cAMP-System vermittelt wird. Ein möglicher Zusammenhang ließe für den Glukagoneffekt auf den insulinstimulierten Glukosetransport eine dem Katecholamin- bzw. dem cAMP-Effekt vergleichbare Hemmkinetik erwarten. Um einen direkten Vergleich herzustellen, untersuchten wir auch den Einfluß einer der eingesetzten Glukagonmenge nahezu äquimolaren Isoproterenolkonzentration auf den insulinstimulierten Glukosetransport. Sodann beobachteten wir den Effekt sehr hoher cAMP-Spiegel, hergestellt durch Vorinkubation der Fettzellen mit Glukagon und Isoproterenol in Kombination mit Forskolin, welches direkt eine katalytische Untereinheit der Adenylatcyclase stimuliert (Seamon, 1981).

In Verbindung mit den an entsprechender Stelle aufgeführten Ergebnissen früherer Studien sollen die Resultate der vorliegenden Arbeit Aufschluß über den zellulären Wirkmechanismus des Glukagons geben.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien

HEPES-Puffer bestehend aus

Hepes 25 mM	(Sigma Chemicals, München)
NaCl 131 mM, KCl 4,8 mM, CaCl ₂ 2,5 mM	
KH ₂ PO ₄ 1,2 mM und MgSO ₄ 1,2 mM	(Merck, Darmstadt)
Kollagenase	(Worthington Biochem. Corp.)
Rinderalbumin	(Novo Industri, Bagsvaerd)
Insulin (Rind) (1 E = 6,67 µM)	(Hoechst AG, Frankfurt)
D-Glukose	(Merck, Darmstadt)
¹²⁵ I-Insulin	(Novo Industri, Bagsvaerd)
3-O-Methylglukose	(Roth, Karlsruhe)
3-O-Methyl(¹⁴ C)glukose	(Amersham, Braunschweig)
Phloretin	(Sigma Chem., Deisenhofen)
Silikonöl (D = 0,99)	(Wacker Chemie,)
Glukagon (MG = 3485)	(Hoechst AG, Frankfurt)
Isoproterenol	(Serva, Heidelberg)
Forskolin	(Calbiochem, Frankfurt)
Nanormon (= Wachstumshormon)	(Novo, Mainz)
Norepinephrin (NEPI)	(Sigma Chemie, Deisenhofen)
ACTH, TSH, LH und Sekretin	(Sigma Chemie, Deisenhofen)

2.2. Herstellung isolierter Fettzellen

Den ad libitum gefütterten männlichen Sprague Dawley Ratten (Körpergewicht 160 - 200 g) wurde nach Dekapitation der epididymale und der retroperitoneale Fettkörper herauspräpariert. Der Aufschluß der Gewebepräparate erfolgte mit Kollagenase (2 mg/ml) nach der Methode von Rodbell (1964) eine Stunde lang unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C und pH = 7,4.



Alle Inkubationen wurden in Krebs-Ringer-Hepes-Puffer vorgenommen, dem kristallines Rinderserum (2,5 %) beigelegt waren. Nach dem Auswaschen mit nachfolgender Zentrifugation (4 mal bei 300 g) und Absaugen des Überstands bleibt im Rückstand ein Konzentrat an suspendierten Fettzellen mit einer Dichte von $4,5 - 5,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

Zur Aufrechterhaltung der intrazellulären ATP-Konzentrationen enthielt das Inkubationsmedium 16 mM D-Glukose, da sich in Gegenwart von cyclo-AMP produzierenden Substanzen der ATP-Gehalt der Fettzelle verringert (Kirsch et al., 1984a), wodurch der Insulin-effekt auf den Glukosetransport gehemmt (Kono, 1978; Siegel, 1980; Häring, 1981b) und die Insulinbindung verringert wird (Häring et al., 1981a).

2.3. Bestimmung der Insulinbindung

In Suspension gehaltene Fettzellen ($4,5 - 5,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 30 Minuten bei 37°C mit Glukagon und den anderen Hormonen vorinkubiert. Zur Einstellung der gewünschten Insulinkonzentration wurde in jedem Cup 5 $\mu\text{E/ml}$ $\text{A}^{14}\text{-}^{125}\text{J}$ markiertes Insulin (250 Ci/g) und "kaltes" Insulin von 0 bis 1000 μE zur Einstellung der gewünschten Endkonzentration zusammengegeben. Nach 20 Minuten Inkubation wurden jeweils 400 μl Portionen in Polyäthylenzentrifugenröhrchen pipettiert. Bei 10000 g in der Tischzentrifuge gelangten die Fettzellen durch eine Trennschicht aus 0,1 ml Dinonylphtalat (Gliemann et al., 1972) in den Überstand. Dieser wurde abgeschnitten und die Aktivität des gebundenen Insulins danach im Gammazähler bestimmt.

Die unspezifische, nicht rezeptorgebundene Aktivität wurde durch Inkubation mit einem Überschuß an "kaltem" Insulin (1 E/ml) ermittelt und von den gemessenen Werten abgezogen.

2.4. Messung des 3-O-Methylglukosetransports

Der Glukosetransport wurde mit radioaktiv markierter 3-O-Methylglukose mit Hilfe einer nach Whitesell & Gliemann (1979) modifizierten Methode gemessen (Häring et al., 1981a). Die 3-O-Methylglukose akkumuliert in Adipozyten, ohne weiter metabolisiert zu werden und besitzt gegenüber der von anderen Arbeitsgruppen benutzten Deoxyglukose (z.B. Green, 1983) den Vorteil, daß der Transport nicht vom ATP-Gehalt der Zelle abhängt. Die Glukoseaufnahme in die Fettzelle wird dadurch mit gut reproduzierbarer experimenteller Genauigkeit erfaßt.

Nach 30 Minuten Vorinkubation der gepackten Fettzellen ($4,5 - 5,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit oder ohne Glukagon oder den anderen Substanzen im HEPES-Puffer bei 37°C und $\text{pH} = 7,4$ wurde der Glukosetransport durch Zugabe von Insulin in den angegebenen Konzentrationen bis zu einem Maximum stimuliert, das nach 20 Minuten erreicht war. Dann wurde die Messung gestartet durch Vermischen von 100 μl -Portionen aus den vorbereiteten Fettzellinkubationen mit 225 μl der radioaktiven (0,1 μCi) Methylglukoselösung (Endkonzentration im Testgemisch 0,5 mM). Der Transport wurde nach 4 Sekunden gestoppt durch Einbringen des Reaktionsgemisches aus der Mischpipette (Gilson Medical Electronics, Frankreich) in 5 ml einer Phloretin enthaltenden Lösung (1 mM in physiologischer Kochsalzlösung). Die anschließende Zentrifugation durch das Silikonöl (30 Sekunden bei 1000 g) trennt die Fettzellen von der radioaktiven Inkubationslösung, so daß die zellständige Radioaktivität im Überstand abgesaugt und in 10 ml Szintigel im Beta-Spektrometer gemessen werden kann.

Um den unspezifischen Anteil der zellständigen Aktivität zu ermitteln, der durch reine Diffusion sowie einem extrazellulären Restanteil an nicht transportierter Aktivität zustande kommt, wurden bei jeder Versuchsreihe Testansätze mit Phloretin (1 mM) durchgeführt. Alle Messungen wurden um diese unspezifische Aktivität korrigiert und repräsentieren somit den tatsächlichen Glukose-

transport. Die Angabe der 3-O-Methylglukoseaufnahme während der Mischungszeit (4 sec) erfolgt in Prozent des Gleichgewichtstransports, bei dem der maximal mit Insulin stimulierte Glukosetransport erst nach 25 Minuten Inkubationsdauer gestoppt wurde.

Die angegebenen Daten von Insulinbindung und Glukosetransport entstammen den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführten Bestimmungen.

Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem gepaarten doppel-seitigen Student-t-Test berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Effekt von Glukagon und anderen Peptidhormonen auf die Insulinbindung

Affinität und Zahl der vorhandenen Insulinrezeptoren regulieren die Wirksamkeit des sich extrazellulär befindlichen Insulins. Erster Angriffspunkt eines möglichen Hormoneffekts auf die Insulinsignalübermittlung könnte der Insulinrezeptor sein, weshalb zunächst der Einfluß von Glukagon und einigen Insulinantagonisten auf die Insulinbindung untersucht wurde.

Nach 30 Minuten Vorinkubation mit 0,1, 1 oder 10 µg/ml Glukagon wird die Insulinbindung in Gegenwart niedriger Insulinkonzentrationen (0,03 - 0,17 nM) um durchschnittlich $14 \pm 2,4$, $22 \pm 3,4$ oder $29 \pm 3,3$ % gehemmt (Abb. 1).

Wie man aus dem Scatchard-Diagramm (Abb. 2) ersehen kann, wird bevorzugt die hochaffine Insulinbindung vermindert. Im Scatchard-Diagramm wird das Verhältnis von gebundenem zu freiem Insulin in Abhängigkeit von dem eingesetzten Insulin aufgetragen. Daß dabei die Bindungskurven der verschiedenen Glukagonkonzentrationen auf einen gemeinsamen Abszissenschnittpunkt hin konvergieren, bedeutet, daß die Anzahl der vorhandenen Insulinrezeptoren annähernd gleich bleibt.

Von den untersuchten Peptidhormonen zeigten eine signifikante Hemmung der Insulinbindung lediglich Norepinephrin (10^{-7} M) und Isoproterenol (10^{-5}), das Wachstumshormon Nanormon (2 mM) blieb knapp über der Signifikanzgrenze ($p = 0,06$). ACTH, TSH, LH und Sekretin haben in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Insulinbindung (Tab. 1).

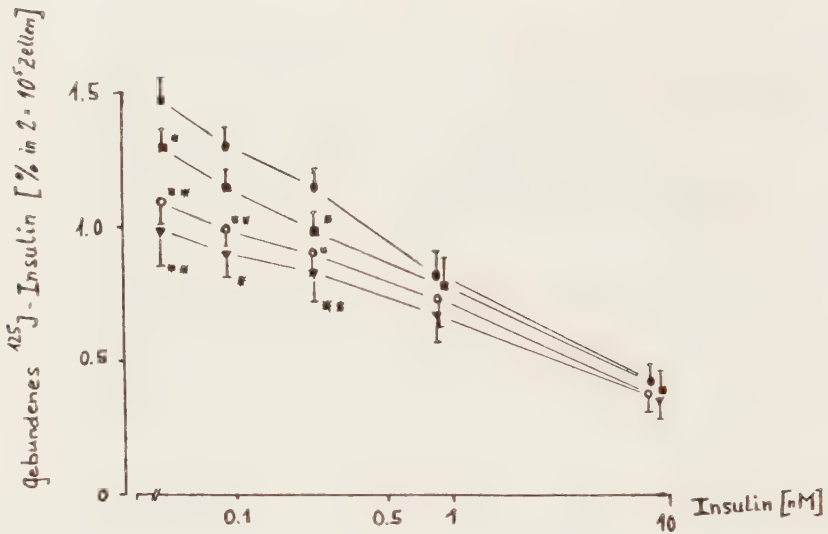


Abb. 1: Effekt von Glukagon auf die Insulinbindung.
 Die Fettzellen wurden ohne (● - ●) und mit Glukagon
 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (■ - ■), 1 $\mu\text{g/ml}$ (○ - ○) und 10 $\mu\text{g/ml}$ (▼ - ▼)
 vorinkubiert.
 Der Ordinatenwert gibt an den Anteil des gebundenen
 ^{125}J -Insulins an der eingesetzten Insulinkonzentration
 (0,067 - 6,7 nM).
 (n = 3; *p < 0,05, **p < 0,01)

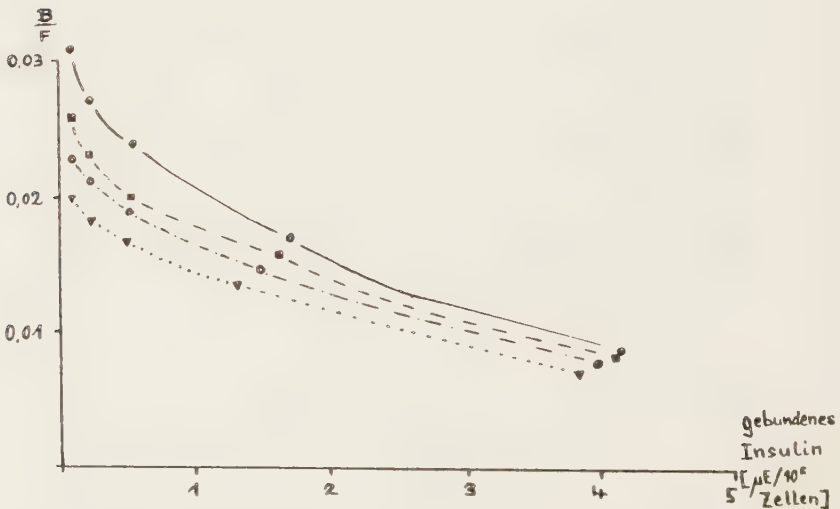


Abb. 2 Scatchard Diagramm von Abb. 1
 (B = zellgebundene, F = freie Insulinkonzentration)

Insulin	10 μ U	25 μ U	100 μ U	1000 μ U	n
Kontrolle	0.26 $\pm$.02	0.59 $\pm$.03	1.69 $\pm$.2	8.0 $\pm$ 1	3
Glukagon 0.1 μ g/ml	0.23 $\pm$.02	0.50 [*] $\pm$.05	1.55 $\pm$.2	8.3 $\pm$ 1	3
1 μ g/ml	0.20 [*] $\pm$.01	0.48 [*] $\pm$.03	1.48 $\pm$.2	7.4 $\pm$ 1	3
10 μ g/ml	0.18 [*] $\pm$.02	0.45 ^{**} $\pm$.05	1.33 $\pm$.1	6.9 $\pm$ 1	3
Kontrolle	0.24 $\pm$.02	0.52 $\pm$.05	1.50 $\pm$.2	6.9 $\pm$.5	8
NEPI 10 ⁻⁷ M	0.16 ^{**} $\pm$.02	0.34 ^{**} $\pm$.03	0.98 $\pm$.1	5.7 $\pm$.5	7
Iso 10 ⁻⁵ M	0.19 ^{**} $\pm$.02	0.41 ^{**} $\pm$.05	1.43 $\pm$.2	6.8 $\pm$.5	8
Kontrolle	0.33 $\pm$.04	0.57 $\pm$.05	1.70 $\pm$.3	9.2 $\pm$.8	3
Nanormon 2 mE	0.23 $\pm$.06	0.56 $\pm$.05	1.60 $\pm$.3	8.6 $\pm$.3	3
Kontrolle	0.25 $\pm$.06	0.52 $\pm$.1	1.74 $\pm$.3	9.2 $\pm$ 2	4
ACTH 100 μ E/ml	0.23 $\pm$.03	0.50 $\pm$.06	1.48 $\pm$.2	7.1 $\pm$.5	4
Kontrolle	0.25 $\pm$.07	0.69 $\pm$.3	1.79 $\pm$.3	8.9 $\pm$ 2	4
TSH 10 μ E/ml	0.25 $\pm$.04	0.67 $\pm$.2	1.63 $\pm$.3	8.0 $\pm$.5	4
Kontrolle	0.25 $\pm$.07	0.61 $\pm$.03	1.93 $\pm$.1	8.0 $\pm$.9	3
LH 100 μ E/ml	0.25 $\pm$.06	0.58 $\pm$.03	1.87 $\pm$.1	7.1 $\pm$.9	3
Kontrolle	0.27 $\pm$.04	0.57 $\pm$.06	1.86 $\pm$.1	8.8 $\pm$.4	3
Sekretin 1 mE/ml	0.26 $\pm$.04	0.54 $\pm$.07	1.72 $\pm$.1	8.3 $\pm$.5	3
Kontrolle	0.33 $\pm$.04	0.67 $\pm$.09	1.88 $\pm$.3	9.2 $\pm$.8	3
Forskolin 10 ⁻⁴ M	0.25 ^{**} $\pm$.05	0.54 $\pm$.1	1.79 $\pm$.3	9.4 $\pm$.7	3

Tab. 1 Effekt von Glukagon, anderen Peptidhormonen und Forskolin auf die Insulinbindung
Die Fettzellen wurden mit den angegebenen Hormonen 30 Min vorinkubiert (16 mM Glukose, 37⁰C, pH = 7,4).
Die ermittelten Werte stehen für den Anteil des gebundenen ¹²⁵J-Insulin an der jeweils eingesetzten Insulinmenge (10 μ U Insulin entsprechen 0,067 nM; *p < 0,05, **p < 0,01).

3.2 Effekt von Glukagon auf die Insulinstimulation des Glukosetransportes

Die insulininduzierte Stimulation des Glukosetransportes folgt einer Sättigungskinetik, bei der $V_{\max}$ des Transports erhöht und die Affinität des Glukosecarriers annähernd gleich bleibt (Häring et al., 1981a). Durch Vorinkubation der gepackten Fettzellen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ Glukagon wird die Insulinstimulation des Glukosetransportes um $15 \pm 2,3 \%$ bzw. $34 \pm 0,8 \%$ bei Insulinkonzentrationen über 0,17 nM signifikant gehemmt (Abb. 3).

Das Insert der Abb. 3 zeigt den rein durch Insulin stimulierten Glukosetransport, ausgedrückt in Prozent des Maximalwerts. Dazu wurden die jeweiligen basalen Transportraten (ohne Insulin) von den insulinstimulierten Werten abgezogen. Die Dosiswirkungskurve des Insulins für den glukagongehemmten Transport (5 $\mu\text{g/ml}$) zeigte keine Verschiebung nach rechts. Der Terminologie nach Kahn et al. (1978) folgend ist die Insulinempfindlichkeit ("sensitivity") demnach nicht wesentlich beeinträchtigt. Die halbmaximale Insulinwirkdosis bleibt in etwa konstant bei 1 nM. Die Hemmwirkung des Glukagons wird vor allem durch eine Verminderung der maximalen Insulinwirksamkeit ("responsiveness") verursacht.

3.3 Konzentrationsabhängigkeit des Glukagonseffekts auf die Insulinstimulation des Glukosetransportes

Sowohl bei 0,67 nM als auch bei 6,7 nM Insulin ist die Stimulierung der Glukoseaufnahme ab Glukagonkonzentrationen über 30 ng/ml signifikant verringert (Abb. 4).

Aus den Daten dieser Meßreihe kann man auch den Einfluß verschiedenen hoher Insulinkonzentrationen auf die glukagoninduzierte Hemmung des Glukosetransportes analysieren. Im Insert der Abb. 4 ist dazu der rein durch Insulin (0,67 nM und 6,7 nM) stimulierte Glukosetransport (vgl. Insert Abb. 3) im Verhältnis zum ungehemmten Transport ($\hat{=} 100 \%$) dargestellt. Auch wenn kein signifikanter

Unterschied auftritt, hat es doch den Anschein, daß Glukagon die Insulinwirksamkeit ("responsiveness") bevorzugt beim hoch stimulierten Glukosetransport herabsetzt.

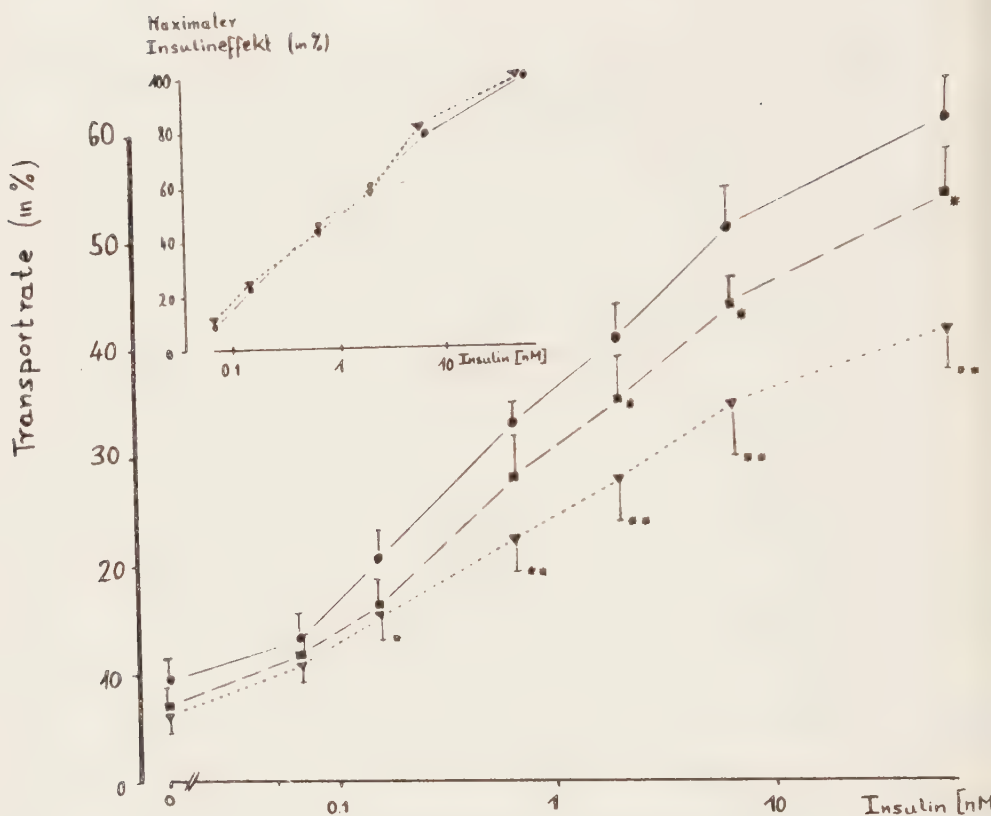


Abb. 3: Glukagoneffekt auf die Insulinstimulation des Glukose-
transports.

Die Fettzellen wurden ohne (●-●) oder zusammen mit 0.5 µg/ml (■-■) bzw. 5 µg/ml (▼-▼) Glukagon vorinkubiert (37°C, 30 min). Anschließend wurde Insulin zugegeben und nach 20 min der Glukosetransport gemessen. (n=5, *p < 0,05, **p < 0,01).

Das Insert zeigt die Insulinstimulation des Glukosetransports der Kontrollreihe (●-●) und der Testreihe mit 5 µg/ml Glukagon (▼-▼) in Prozent des maximalen Insulineffekts.

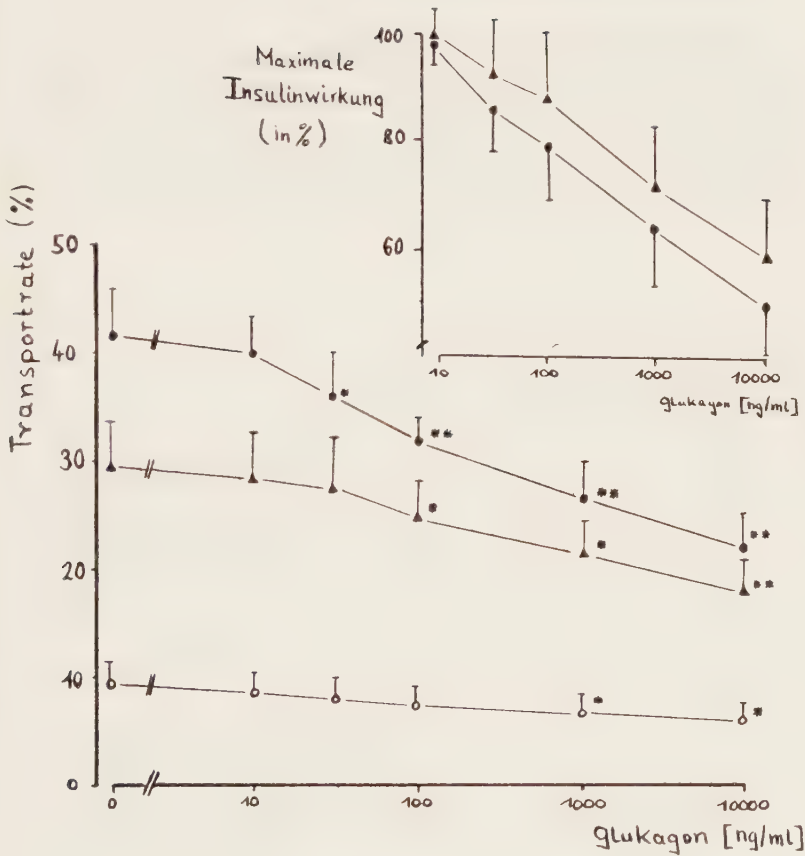


Abb. 4 Konzentrationsabhängigkeit des Glukagoneffekts auf die Insulinstimulation des Glukosetransports.

Die Fettzellen wurden 30 min mit den angegebenen Glukagonkonzentrationen (0 - 10 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Anschließend wurde Pufferlösung (o-o) oder Insulin 0.67 nM (▲-▲) und 6.7 nM (●-●) zugegeben. Nach 20 min wurde der Glukosetransport gemessen.

(n=5, *p < 0.05, **p < 0.01)

Das Insert zeigt die Hemmung der Insulinstimulation bei 0.67 nM (▲-▲) und 6.7 nM (●-●) Insulin in Abhängigkeit von der Glukagonkonzentration.

3.4 Zeitabhängigkeit des Glukagoneffekts auf den Glukosetransport

Die Fettzellen wurden von $t = 0$ (gleichzeitige Zugabe von Glukagon und Insulin) bis $t = 30$ in Abständen von 10 Minuten mit $1 \mu\text{g/ml}$ Glukagon vorinkubiert. Dabei trat erst nach 30 Minuten Vorinkubation eine signifikante Hemmung (ca. 25 %) der Glukoseaufnahme auf (Abb. 5). Bei gleichzeitiger Zugabe von Glukagon und Insulin ($0,67 \text{ nM}$) wird der Glukosetransport sogar gering stimuliert.

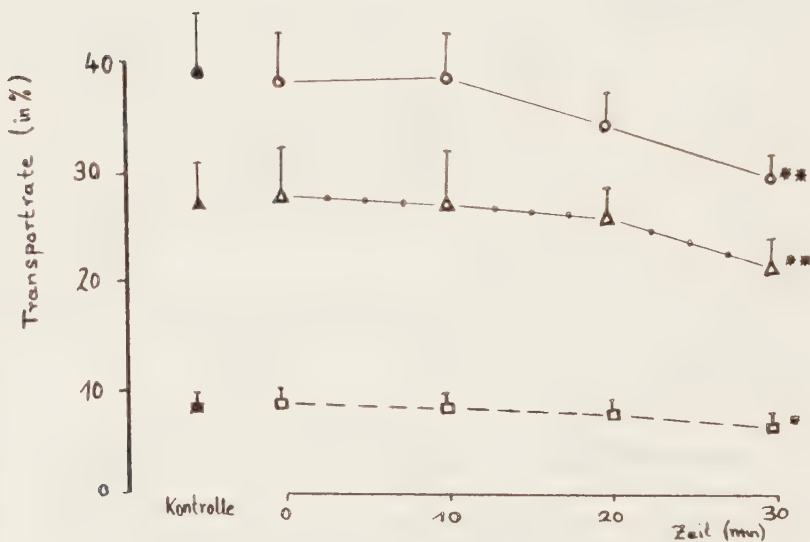


Abb. 5 Zeitabhängigkeit des Glukagoneffekts auf den Glukosetransport

Die Fettzellen wurden einmal ohne (●, ▲, ■) und mit $1 \mu\text{g/ml}$ Glukagon inkubiert. In die Glukagon enthaltenden Suspensionen wurden zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten Pufferlösung (□-□), entweder $0,67 \text{ nM}$ (▲-▲) oder $6,7 \text{ nM}$ (○-○) Insulin gegeben und nach weiteren und nach weiteren 20 min wurde der Glukosetransport gemessen. ($n = 4$, ** $p < 0,01$).

3.5 Reversibilität des Glukagoneffektes auf den Glukosetransport

Um die Wirkdauer ("off-kinetic") des aus dem Inkubationsmedium entfernten Glukagons zu bestimmen, wurde ein Teil der Fettzellen nach 30-minütiger Vorinkubation mit Glukagon (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ca. 5 Minuten lang gewaschen. Anschließend wurde Insulin (0,67 nM oder 6,7 nM) zugefügt und nach weiteren 20 Minuten der Glukosetransport gemessen (Tab. 2).

	0,67 nM Insulin	6,7 nM Insulin
Kontrolle	30,5 $\pm$ 2,2	41,7 $\pm$ 1,8
30 Minuten Vorinkubation mit Glukagon (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	26,3 $\pm$ 2,9*	34,0 $\pm$ 4,2*
Glukagonvorinkubation + Auswaschen	28,0 $\pm$ 2,4*	38,8 $\pm$ 4,7

Tab. 2: Reversibilität des Glukagoneffekts auf den Glukosetransport (n = 4, *p < 0,05)

Die im Vergleich zum ungehemmten Transport auf 86 % (Stimulation mit 0,67 nM Insulin) bzw. 82 % (6,7 nM Insulin) signifikant verringerte Glukoseaufnahme erhöht sich durch das Auswaschen des Glukagons auf 93 %. Die Glukagonwirkung wird demnach um mehr als die Hälfte aufgehoben.

3.6 Vergleich der Effekte von Glukagon und Isoproterenol und deren Kombination mit Forskolin auf den Glukosetransport

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß Glukagon in Bezug auf die Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransports im wesentlichen die gleiche Wirkung entfaltet wie die Katecholamine.

Es wurde nun ein Vergleich hergestellt zwischen nahezu äquimolaren Konzentrationen des Katecholamins Isoproterenol ($1 \mu\text{M}$) und Glukagon ($1 \mu\text{g/ml} = 0,3 \mu\text{M}$) hinsichtlich ihres Einflusses auf den stimulierten Glukosetransport (Tab. 3).

In einer früheren Arbeit (Ho, 1982) wurde nach kombinierter Zugabe von Noradrenalin ($1 \mu\text{M}$) und Forskolin ($10 \mu\text{M}$) eine Potenzierung des cAMP-steigernden Effekts beobachtet. Es wurden dabei in Fettzellinkubationen um das sechsfach höhere cAMP-Spiegel als nach Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Forskolin gemessen.

Um in den Fettzellen sehr hohe cAMP-Spiegel zu erhalten und deren Effekt auf den Glukosetransport festzustellen, kombinierten wir also Glukagon und Isoproterenol mit einer bezüglich der Wirksamkeit vergleichbaren Konzentration an Forskolin ($10 \mu\text{M}$).

	ohne Insulin	p	0.67 nM Insulin	p	6.7 nM Insulin	p
Kontrolle	8.0±.8		31.5±4.3		43.3±4.0	
Glukagon 1 µg/ml	7.7±.9	.64	21.5±4.3	.02	28.8±3.1	.002
Iso 1 µM	6.7±.5	.27	22.0±4.3	.01	32.0±4.3	.01
Forskolin 10 µM	4.7±1.2	.15	17.3±1.5	.01	32.0±2.9	.001
Forskolin 100 µM	2.5±.4	.01	6.0±3.7	.01	9.8±1.8	.001
Glukagon (1 µg/ml)						
+ Forskolin (10 µM)	4.0±.8	.07	14.3±2.7	.01	21.8±3.5	.001
Iso (1 µM)						
+ Forskolin (10 µM)	3.2±.9	.06	14.5±3.2	.01	18.3±4.1	.001

Tab. 3 Vergleich der Effekte von Glukagon und Isoproterenol und deren Kombination mit Forskolin auf den Glukosetransport.

Die Fettzellen wurden zusammen mit den aufgeführten Substanzen vorinkubiert (30 min, 37°C), anschließend wurde Insulin (0,67 nM oder 6,7 nM) zugefügt und nach 20 min der Glukosetransport gemessen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Gleichgewichtstransport.

Isoproterenol und Glukagon hemmen die Insulinstimulation des Glukosetransports in etwa dem gleichen Ausmaß.

Aus Tab. 3 ist ebenfalls ersichtlich, daß 10 μ M Forskolin die Insulinstimulation des Glukosetransportes um 45 % hemmt und durch kombinierte Zugabe der Hemmeffekt lediglich auf 53 % (mit Glukagon) oder 55 % (mit Isoproterenol) gesteigert wird. Forskolin in höherer Konzentration (100 μ M) zeigt mit 85 % eine hohe Hemmwirkung, obwohl die cAMP-Konzentration in solchen Fettzellen deutlich niedriger gemessen wurde (Ho, 1982).

Es besteht also keine eindeutige Korrelation zwischen cAMP-Spiegel und dem Ausmaß der Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransports.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Insulin aktiviert nach Bindung an den Rezeptor und erfolgter Signalübertragung den Transport von Glukose in die Zelle.

In unseren Experimenten hemmte Glukagon ab 100 ng/ml die Insulinbindung in isolierten Rattenfettzellen bis zu 33 %, jedoch nur im Bereich niedriger Insulinkonzentrationen (0,67 nM). Das Fehlen der glukagoninduzierten Hemmung der Insulinbindung bei Insulinkonzentrationen über 0,67 nM ließe sich erklären nach dem 2-Rezeptoren-Modell über eine Verringerung der hochaffinen Rezeptoren (Hammond, 1972) oder nach dem Modell der "negativen Kooperativität" (DeMeyts et al., 1976) durch eine bevorzugte Hemmung der hochaffinen Bindungsstellen.

Die Stimulation des 3-O-Methylglukosetransportes durch Insulin (0,067 - 67 nM) wird durch Glukagon (0,5 und 5 µg/ml) signifikant bis zu 35 % gehemmt. Glukagon wirkt dabei dosisabhängig in Gegenwart hochphysiologischer und pharmakologischer Insulinkonzentrationen (0,67 und 6,7 nM), wobei ein signifikanter Hemmeffekt bei Glukagonkonzentrationen über 0,1 µg/ml auftritt.

Würde sich der Glukagoneffekt auf die Insulinbindung auf den Glukosetransport auswirken, so wäre eine teilweise Rechtsverschiebung der Insulindosiswirkungskurve im Bereich niedriger Insulinkonzentrationen zu erwarten.

Da eine solche nicht festzustellen ist (vgl. Insert Abb. 3) und offensichtlich der hoch stimulierte Glukosetransport bevorzugt gehemmt wird (vgl. Insert Abb. 4), scheint der Glukagoneffekt auf die Bindungsaffinität nicht für die verminderte Insulinwirkung beim Glukosetransport verantwortlich zu sein. Der Terminologie nach Kahn (1978) folgend setzt Glukose die "responsiveness", d.h. die maximale Insulinwirksamkeit des Glukosetransportsystems herab, während die "sensitivity" (= Empfindlichkeit) gegenüber Insu-

lin keine signifikante Einschränkung erfährt. Da auch die Zahl der Insulinrezeptoren annähernd konstant bleibt (vgl. Abb. 2), sprechen die gesamten Befunde dafür, daß Glukagon die Insulinwirkung nach erfolgter Bindung hemmt. Aus unseren kinetischen Untersuchungen ist zu erkennen, daß diese Hemmung auf Postbindungsebene signifikant erst nach 30 Minuten Vorinkubation mit Glukagon ($1 \mu\text{g/ml}$) erfolgt und zum Teil durch Auswaschen der Fettzellen vor der Insulinstimulation reversibel ist.

Der Einfluß von Glukagon auf die Insulinbindung war bis jetzt noch nicht bekannt. Eine Hemmung des 2-Deoxyglukosetransports durch Glukagonkonzentrationen über $0,01 \mu\text{g/ml}$ wurde von Green (1983) beschrieben, jedoch nur in Anwesenheit von Adenosindeaminase. Die Adenosindeaminase baut im Inkubationsmedium das Adenosin ab, welches bei Fettzellinkubationen *in vitro* akkumulieren kann und durch Aktivierung des Adenosinrezeptors die Adenylatcyclase hemmt (Schwabe et al., 1975). Somit sind die vorliegenden Ergebnisse einerseits Erstbeobachtungen, andererseits bestätigen sie die im folgenden Abschnitte zitierten Katecholamin-Studien.

4.2. Cyclo-AMP als Vermittler der Glukagonwirkung

Da wie eingangs dargelegt Glukagon durch Stimulation der Adenylatcyclase intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht und auf diese Weise die Insulinwirkung antagonisiert, besteht Grund zur Annahme, daß das cAMP-System ähnlich wie bei den Katecholaminen auch bei der Übermittlung der Glukagonwirkung auf Insulinbindung und Insulinstimulation des Glukosetransports eine Rolle spielt. Eine Gegenüberstellung von Ergebnissen vorangegangener Arbeiten mit den Daten unserer Untersuchungen sollte diesen Zusammenhang belegen können.

Katecholamine zeigen bezüglich Insulinbindung und Glukosetransport ein dem Glukagon vergleichbares Hemmverhalten, welches mit Dibutyryl-cAMP nachvollzogen werden konnte (Kirsch et al., 1983; Pessin et al., 1983). Isoprenalin ($10 \mu\text{M}$) und Noradrenalin (1 nM)

hemmen sowohl die Insulinbindung (ca. 35 %) als auch (bis zu 50 %) die Insulinstimulation des Glukosetransportes (Kirsch et al., 1984a).

Während einer durch Isoproterenol (2 μ M) ausgelösten Hemmung des Glukosetransports wurden auf das Dreifache erhöhte cAMP-Spiegel gemessen (Kashiwagi et al., 1983), was den schon zuvor beobachteten Einfluß des cAMP-Systems auf die Regulation des Glukosetransports (Kashiwagi et al., 1982) bestätigte. Passend zu diesen Beobachtungen waren die an zellulären Subfraktionen vorgenommenen Messungen, aus denen sich schließen läßt, daß cAMP die Zahl und die Bereitstellung intrazellulärer Glukosecarrier unterdrückt (Smith et al., 1984), womit sich die glukagoninduzierte Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransports auf Postrezeptorebene erklären ließe.

Wie früher gezeigt werden konnte, (Ho & Shi, 1982) hat eine Vorinkubation mit einer Kombination von Noradrenalin (1 μ M) und Forskolin (10 μ M) einen potenzierenden Effekt auf den cAMP-Spiegel in Fettzellen, dieser steigt daraufhin um das Sechsfache höher als nach Inkubation mit 100 μ M Forskolin. In einem ähnlichen Ausmaß vervielfacht Forskolin die lipolytische Wirkung von Glukagon und ACTH. Hinsichtlich der Insulinstimulation des Glukosetransports ergaben unsere Messungen jedoch nach einer Kombination von Glukagon (1 μ g/ml) oder Isoproterenol (1 μ M) mit Forskolin (10 μ M) lediglich einen additiven Hemmeffekt. Eine deutliche Hemmung (85 %) verursachte dagegen 100 μ M Forskolin, was auf eine direkte Hemmung des Glukosetransports durch Forskolin mit Erniedrigung von V_{max} und Erhöhung der K_M zurückzuführen ist (Kashiwagi et al., 1983).

Das gleiche Verhalten von Glukagon und Isoproterenol sprechen für einen Zusammenhang zwischen Glukagon und cAMP-induzierter Hemmung des Glukosetransports, auch wenn die Hemmung der Insulinstimulation nicht eng mit der Höhe des cAMP-Spiegels korreliert. Eine mögliche Erklärung dafür bieten zahlreiche Arbeiten der letzten

Jahre, in denen ein molekularer Mechanismus der intrazellulären Insulinsignalvermittlung beschrieben wurde, an dem die cAMP-vermittelte Hemmung der Insulinwirkung angreifen könnte.

Es gilt heute als wahrscheinlich, daß Insulin an die α -Untereinheit des Rezeptors bindet (Kasuga et al., 1983).

In der β -Untereinheit des Insulinrezeptors wurde eine tyrosinspezifische Proteinkinase gefunden (Häring et al., 1982, Kasuga, 1982a,b).

Diese Kinase wird durch Autophosphorylierung an Tyrosinresten aktiviert und man vermutet, daß die Weiterleitung eines Insulinsignals vom Rezeptor auf die Enzyme und Transportproteine der Zelle durch Phosphorylierung von Proteinen zustande kommt (Petruzzelli et al., 1982).

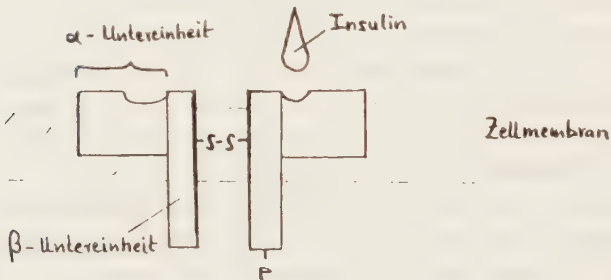


Abb. 6: Modell eines Insulinrezeptors

Nach Vorinkubation von Fettzellen mit Katecholaminen am teilgereinigten Insulinrezeptor wurde eine um ca. 50 % verringerte Aktivität der Insulinrezeptorproteinkinase festgestellt (Häring et al., 1986a). Die verminderte Aktivität wird dabei durch eine Erhöhung der K_m der Proteinkinase für ATP verursacht. Weiterhin wurde bei der supprimierten Proteinkinase eine Phosphorylierung an Serinresten gefunden, die wohl für die Hemmung des Enzyms verantwortlich ist.

Wahrscheinlich ist deshalb nicht die Erhöhung des cAMP-Spiegels selbst, sondern die Aktivierung der cAMP-abhängigen serinspezifischen Proteinkinase über eine Phosphorylierung der Rezeptorkinase für die Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransportes verantwortlich (Häring et al., 1986b).

4.3. Gibt es eine glukagoninduzierte Insulinresistenz?

Unsere Ergebnisse ergänzen auf molekularer Ebene die bereits bekannten Wirkungen des Insulinantagonisten Glukagon. Als nächstes soll nun die physiologische Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse diskutiert werden. Verglichen mit den bei der Ratte auftretenden Glukagonspiegeln von 0,1 - 2,0 ng/ml, nach maximaler Stimulation 5,0 ng/ml (Helman et al., 1980), beobachteten wir erst bei Konzentrationen über 100 ng/ml signifikante Effekte. Glukagonkonzentrationen in dieser Größenordnung werden auch dazu benötigt, in Fettzellen die Lipolyse zu stimulieren (Honner & Saggerson, 1980). Die vorliegenden Daten sind trotzdem aussagefähig, denn es ist bekannt, daß zur Erzielung metabolischer Wirkungen in vitro im allgemeinen höhere Konzentrationen an Eiweiß- und Peptidhormonen benötigt werden als in vivo. Es ist demnach gut möglich, daß auch die bei höheren Konzentrationen festgestellten insulinantagonistischen Wirkungen des Glukagons auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind.

Der Glukagonserumspiegel des Menschen steigt unter Normalbedingungen nicht über 0,15 ng/ml, im Fastenzustand bewegt er sich im oberen Normbereich (Marliss et al., 1970).

Auf das vielfache erhöhte Glukagonspiegel finden sich bei einem Glukagonom. Solche Patienten mit exzessiver Glukagonsekretion weisen eine milde Glukoseintoleranz auf (Rizza et al., 1979; Leichter 1980), was vermutlich auf die kompensatorische Hyperinsulinämie zurückzuführen ist (Lawrence & Dorsch, 1980). Während bei erhöhten Cortisol- und STH-Spiegeln der orale Glukosebelastungstest pathologisch ausfällt, ist dies nicht der Fall bei Hyperglukagonämie - sowohl bei Stoffwechselgesunden (Liljenquist & Robin, 1979) als auch bei gut eingestellten Diabetikern (Sherwin et al., 1976; Bratusch-Marrain et al., 1981). Bei ausreichender Insulinversorgung scheinen also erhöhte Glukagonspiegel keine wesentliche Insulinresistenz hervorzurufen.

Beim Diabetes mellitus jedoch wirkt sich nicht nur der Insulinmangel nachteilig aus, auch ein relativer Insulinüberschuß (zu hohe Dosierung, Nahrungskarenz, unerwartete körperliche Belastung, Alkoholexzeß) begünstigt das Zustandekommen der zuerst von Somogyi (1959) beschriebenen posthypoglykämischen Insulinresistenz. Ist in der Frühphase der Gegenregulation neben dem Glukagon vor allem das Adrenalin für die verringerte Glukoseutilisation verantwortlich, tragen mit etwas Verzögerung erhöhte Cortisol- und STH-Spiegel dazu bei, daß die Insulinresistenz trotz wiederhergestellter Normoinsulinämie mitunter bis zu 12 Stunden andauert (Shamoon, 1981; Rizza et al., 1982; Popp et al., 1982; Bratusch-Marrain et al., 1982).

Dem Glukagon wurde früher sogar eine kausale Rolle bei der Manifestation des Diabetes mellitus zugeschrieben. Unger glaubte damals den Schluß eines primären A-Zellendefektes aus Studien ziehen zu können, in denen die Glukagonsekretion in Gegenwart hoher Blutzuckerspiegel nicht unterdrückt wurde (Benett et al., 1976; Unger, 1978). Damit konnte er erklären, weshalb in erster Linie schlecht

eingestellte Diabetiker bis zum zehnfachen über der Norm ($> 1,0$ ng/ml) liegende Glukagonspiegel aufwiesen (Müller et al., 1973; Gerich et al., 1976).

Diese längere Zeit kontrovers diskutierte Hypothese wurde verworfen, als gezeigt werden konnte, daß die A-Zellen Glukagon nicht im Überschuß sezernieren, wenn die Sekretionsfähigkeit der B- und D-Zellen nicht eingeschränkt ist (Larkins et al., 1978). Im gesunden Pankreas supprimieren nämlich Insulin und Somatostatin über parakrine (= inselzellinterne) Regulationsmechanismen die Glukagonsekretion (Asplin et al., 1981, 1984). Bei fehlender Insulinsekretion, also bei Typ I-Diabetikern, liegen deshalb die Glukagonspiegel höher als bei den Typ II-Diabetikern mit nur unzureichender Insulinsekretion (Seino et al., 1978, Unger & Orci, 1981). Eine mögliche therapeutische Perspektive bietet diesen Patienten die Insulinpumpe. Nach Umstellung auf die kontinuierliche subkutane Insulininjektion erfolgte in einer Studie von Raskin et al. (1979) ein Abfall der erhöhten Glukagonspiegel in einem zuvor mit drei Insulinspritzen täglich behandelten Patientenkollektiv bis in den Bereich einer gesunden Vergleichsgruppe. Leider läßt sich die Versorgung aller Patienten mit den derzeit gängigen Insulinpumpen vor allem wegen der Gefahr unbemerkter Hypoglykämien nicht verwirklichen. Da sich durch die herkömmliche Behandlung eine Hyperglukagonämie in der Praxis wohl nicht vermeiden läßt, ist anzunehmen, daß auch eine geringe glukagoninduzierte Insulinresistenz zur Verschlechterung der diabetischen Stoffwechseleinstellung beiträgt.

5. Schlußbemerkung

Die Prävalenz des Diabetes mellitus in der Gesamtbevölkerung der BRD liegt bei 2 - 3 % mit steigendem Anteil der Typ II-Diabetiker. Bei etwa 80 % aller Patienten besteht kein absoluter Insulinmangel, sondern eine Resistenz der Körpergewebe gegen Insulin. Um eine entsprechende Wirkung zu erzielen, sind deshalb in der Anfangsphase des sogenannten "Altersdiabetes" die Insulinspiegel häufig auf das 2 - 3fache erhöht, insbesondere bei einer meist gleichzeitig bestehenden Adipositas. Die stetige Hyperinsulinämie führt auf längere Sicht zu den charakteristischen makroangiopathischen Gefäßwandveränderungen. Wird die Insulinresistenz als ursächlicher Faktor beseitigt - bei manchen Patienten gelingt dies durch alleinige Gewichtsreduktion - lassen sich derartige Diabetesspätfolgen in ihrer Entstehung verhindern.

Glukagon trägt über die beschriebene Hemmung der zellulären Glukoseaufnahme zur Entstehung der Insulinresistenz bei. Dennoch ist es nicht meine Absicht, nun die klinische Bedeutung erhöhter Glukagonspiegel in den Vordergrund zu stellen. Das Ergebnis dieser Arbeit ist vielmehr unter dem Gesichtspunkt zu sehen, daß am Modell des Glukagons der zelluläre Wirkmechanismus der Entstehung einer Insulinresistenz näher erforscht wurde und damit etwas mehr Licht in die "black box" der Insulinsignalübermittlung gebracht wurde.

6. Zusammenfassung

An isolierten Rattenfettzellen wurde die Wirkung insbesondere von Glukagon auf die Insulinbindung und die Insulinstimulation des Glukosetransports untersucht. In 30 Minuten mit Glukagonkonzentrationen von 0,1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ vorinkubierten Fettzellen hemmt Glukagon dosisabhängig die Insulinbindung bis zu 33 %. Auch das Katecholamin Norepinephrin (10^{-7} M) hemmt signifikant die Insulinbindung, von den anderen untersuchten Insulinantagonisten (ACTH, TSH, LH und Sekretin) mit Ausnahme des Wachstumshormons Nanormon ($p = 0,06$) wird kein wesentlicher Einfluß auf die Insulinbindung ausgeübt.

Die Stimulation des 3-O-Methylglukosetransports durch Insulin (0,067 bis 67 nM) wird durch 30 Minuten Vorinkubation mit Glukagon (0,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$) bis zu 35 % gehemmt. Nach Vorinkubation mit Glukagon (0,01 - 10 $\mu\text{g/ml}$) trat eine signifikante Hemmung ab einer Glukagonkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ auf, wobei offensichtlich der Insulineffekt stärker beim maximal (6,7 mM Insulin) als beim submaximal (0,67 nM Insulin) stimulierten Glukosetransport abgeschwächt wird. Da sich die Insulindosiswirkungskurve nicht nach rechts verschiebt, verursacht nicht der Glukagoneffekt auf die Insulinbindung die verminderte Insulinwirkung auf den Glukosetransport, vielmehr scheint ein Postbindungsdefekt vorzuliegen. Bei Glukagonzugabe (1 $\mu\text{g/ml}$) gleichzeitig mit Beginn der Insulinstimulation oder bis zu 30 Minuten zuvor war die Hemmung des Glukosetransports erst nach 30 Minuten Vorinkubation signifikant. Ein Auswaschen des Glukagons (1 $\mu\text{g/ml}$) nach der Vorinkubationszeit (30 min) reduziert die Hemmwirkung auf die Insulinstimulation des Glukosetransports auf etwa die Hälfte.

30 Minuten Vorinkubation mit einer Kombination von Glukagon (1 $\mu\text{g/ml}$) oder Isoproterenol (1 μM) mit dem direkt die Adenylcyclase stimulierenden Forskolin (10 μM) hat lediglich einen additiven Effekt auf die Hemmung der Insulinstimulation des Glukosetransports, obwohl in einer früheren Arbeit nach kombinierter Zugabe von Noradrenalin und Forskolin in Fettzellen auf das sechsfach

erhöhte cAMP-Spiegel gemessen worden waren. Auch wenn Hemmung der Insulinwirkung und cAMP-Spiegel nicht eng miteinander korrelieren, lassen die bisherigen Ergebnisse den Schluß zu, daß Glukagon über den gleichen Wirkmechanismus die Insulinbindung sowie die Insulinstimulation des Glukosetransports hemmt. Als Vermittler fungiert das cAMP-System, welches über eine alternative Phosphorylierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors in die Insulinsignalübertragung im Postrezeptorbereich eingreift.

Der hier dargelegte Mechanismus beschreibt die Situation einer peripheren Insulinresistenz, die sich allerdings bei Stoffwechselgesunden auch bei erheblich erhöhten Glukagonspiegeln klinisch nicht manifestiert. Bei insulinpflichtigen Diabetikern jedoch kann Glukagon die regelmäßig anzutreffende Insulinresistenz mitverursachen, zumal es wegen des Insulinmangels in den Inselzellen in vermehrtem Maße gebildet und ins Blut abgegeben wird.

Literatur

- (1) Asplin, C.M., Paquette, T.L., Palmer, J.P. (1981) In vivo inhibitions of glucagon secretion by paracrine beta cell activity in man. *J. Clin. Invest.* 68, 314-318
- (2) Asplin, C.M., Hollander, P.M., Palmer, J.P. (1984) How does glucose regulate the human pancreatic A cell in vivo? *Diabetologia* 26, 203-207
- (3) Bennett, P.h., Aronof, S.L., Unger, R.H. (1976) Evidence for an insulin-independent alpha-cell abnormality in human diabetes. *Metabolism (Suppl. 1)* 25, 1527-1529
- (4) Birnbaumer, L., Pohl, S.L. (1973) Relation of glucagon-specific binding sites to glucagon-dependent stimulation of adenylyl cyclase activity in plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.* 248, 2056-2061
- (5) Bratusch-Marrain, P.R., Waldhäusl, W., Grubeck-Loebenstein, B., Korn, A., Vierhapper, H., Nowotny, P. (1981) The role of "diabetogenic" hormones on carbohydrate and lipid metabolism following oral glucose loading in insulin dependent diabetics: Effect of acute hormone administration. *Diabetol.* 21, 387-393
- (6) Bratusch-Marrain, P.R., Smith, D., DeFronzo, R.A. (1982) The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 55, 973-982
- (7) Butcher, R.W., Baird, C.E., Sutherland, E.W. (1968) Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3,5'-monophosphate levels in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 243, 1705-1712
- (8) Cahill, G.F. jr. (1976) *Insulin and Glucagon*. In: *Peptide Hormones*, ed. Parsons, J.A., University Park Press, Baltimore, S. 1877-1888
- (9) Cherrington, A.D., Lilienquist, J.e., Shulman, G.I., Williams, R.E., Lacy, W.W. (1979) Importance of hypoglycemia induced glucose production during isolated glucagon deficiency. *Am. J. Physiol.* 236, E263-271
- (10) Cushman, S.W., Wardzala, L.J. (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.* 255, 4758-4762
- (11) DeMeys, P., Bianco, A.R., Roth, J. (1976) Site-site interactions among insulin receptors: characterization of the negative cooperativity. *J. Biol. Chem.* 251, 1877-1888
- (12) Exton, J.H., Park, C.R. (1966) The stimulation of gluconeogenesis from lactate by epinephrine, glucagon, and cyclic 3',5'-adenylate in the perfused rat liver. *Pharmacol. Rev.* 18, 181-188

- (13) Guben, A.M., Jahchan, T., Swierczewski, W., Rosselin, G. (1982) Ontogeny of glucagon and isoproterenol induced cyclic 3',5'-adenosine monophosphate production in adipocytes isolated from the inguinal adipose tissue of developing rats. *J. Dev. Physiol.* 4/1, 75-83
- (14) Gerich, J.E., Langlois, M., Naocco, C., Lorenzi, M. (1976) Comparison of the suppressive effects of elevated plasma glucose and free fatty acid levels on glucagon secretion in normal and insulin dependent diabetic subjects. Evidence for selective alpha-cell insensitivity to glucose in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 58, 320-327
- (15) Gliemann, J., Osterlind, K., Vinten, J., Gammeltoft, S. (1972) A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. *Biochem. Biophys. Acta* 286, 1-9
- (16) Green, A. (1983) Glucagon inhibition of insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake by rat adipocytes in the presence of adenosine deaminase. *Biochem. J.* 212, 189-195
- (17) Hagen, I.H. (1961) Effects of glucagon on the metabolism of adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 236, 1023-1027
- (18) Hammond, J.M., Jarett, L., Marit, I.K., Doughaday, W.H. (1972) Heterogeneity of insulin receptors on fat cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49, 1122-1128
- (19) Häring, H.U., Renner, R., Hepp, K.D. (1976) Hormonal control of cyclic AMP turnover in isolated fat cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 5, 295-302
- (20) Häring, H.U., Biermann, E., Kemmler, W. (1981a) Coupling of insulin binding and insulin action. *Am. J. Physiol.* 240, E556-E565
- (21) Häring, H.U., Rinninger, F., Kemmler, W. (1981b) Decreased insulin sensitivity due to a postreceptor defect as a consequence of ATP-deficiency in fat cells. *FEBS Lett.* 132, 235-238
- (22) Häring, H.U., Kasuga, M., Kahn, C.R. (1982) Insulin receptor phosphorylation in intact adipocytes and in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1528-1545
- (23) Häring, H.U. (1986) Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-dependent by catecholamine treatment in vitro. *Biochem. J.* 234, 59-66
- (24) Häring, H.U., Kirsch, D., Obermaier, B., Ermel, B., Machicao, F. (1986b) Tumor-promoting phorbol esters increase the K_m of the ATP-binding site of the insulin receptor kinase from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 3869-3875
- (25) Helman, A.M., Amiran, R., Nicolaidis, S., Assan, R. (1980) Glucagon release induced by ventrolateral hypothalamic stimulation in the rat. *Endocrinol.* 106, 1612-1619
- (26) Hepp, K.D., Renner, R. (1972) Insulin action on the adenylyl cyclase system: antagonism to activation by lipolytic hormones. *FEBS Lett.* 20, 191-194

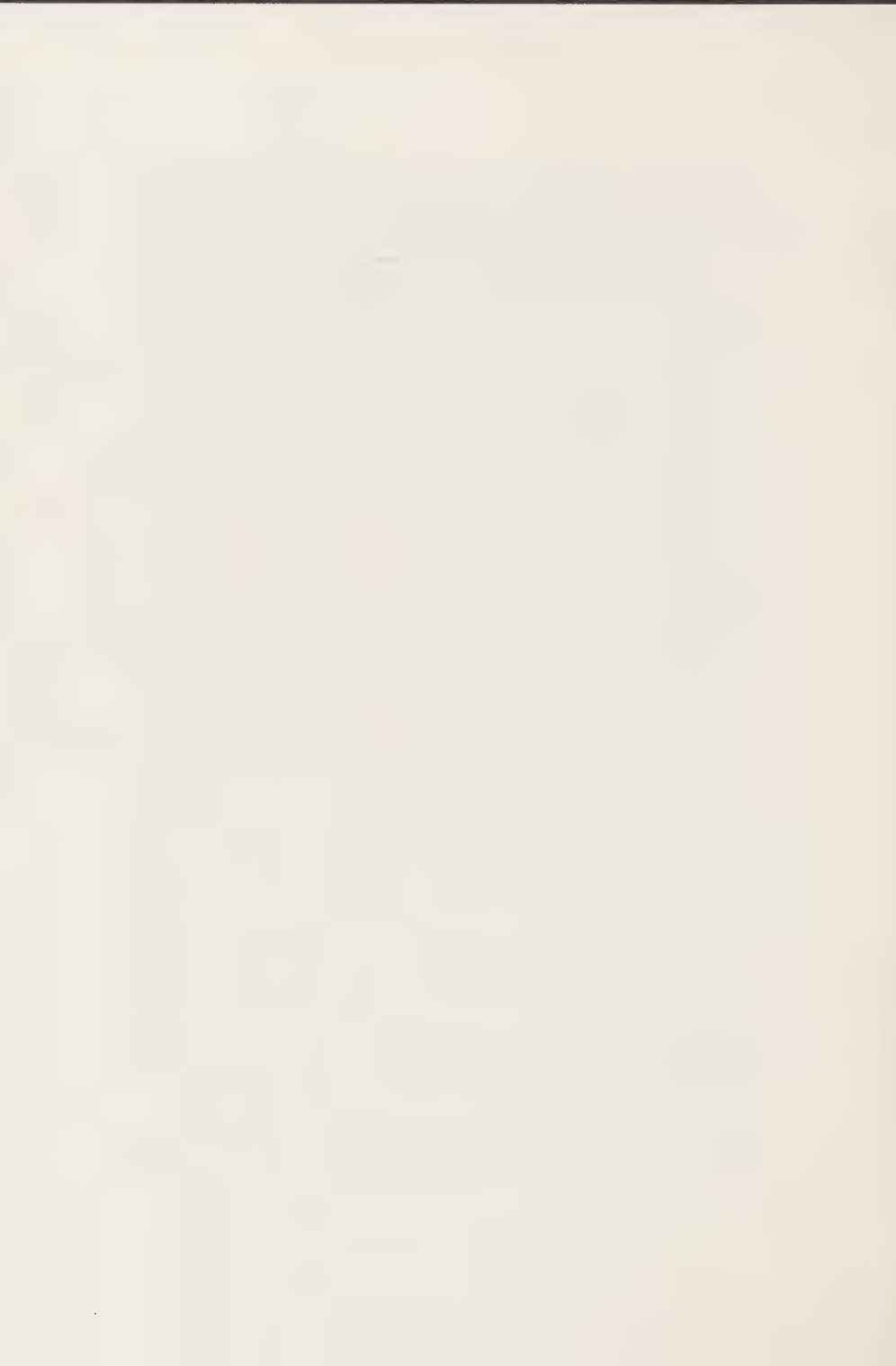
- (27) Hayworth, C.M., Houslay, M.D. (1983a) Challenge of hepatocytes by glucagon triggers a rapid modulation of adenylate cyclase activity in isolated membranes. *Biochem. J.* 214, 93-98
- (28) Heyworth, C.M., Wallace, A.V., Houslay, M.D. (1983a) Insulin and glucagon regulate the activation of two distinct membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterases in hepatocytes. *Biochem. J.* 214, 99-110
- (29) Ho, R., Shi, Q.H. (1982) Forskolin as a novel lipolytic agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 157-164
- (30) Hollenberg, M.D., Cuatrecasas, P. (1975) Insulin: interaction with membrane receptors and relationship to cyclic purine nucleotides and cell growth. *Fed. Proc.* 34, 1556-1563
- (31) Hollenberg, M.D. (1982) Membrane receptors and hormone action. II. New perspectives for receptor-modulated cell function. *TIBS Jan.* 25-28
- (32) Honnor, R.C., Saggerson, E.D. (1980) Altered lipolytic response to glucagon and adenosine deaminase in adipocytes from starved rats. *Biochem. J.* 188, 757-761
- (33) Houslay, M.D., Heyworth, C.M. (1983) Insulin: in search of a mechanism. *TIBS Dec.*, 449-452
- (34) Illiano, G., Cuatrecasas, P. (1972) Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin. *Science* 175, 906-908
- (35) Jacobs, S., Sahyoun, N.E., Saltiel, A.R., Cuatrecasas, P. (1983) Phorbol esters stimulate the phosphorylation of receptors for insulin and somatomedin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6211-6213
- (36) Johnson, M.E.M., Das, N.M., Butcher, F.R., Fain, J.N. (1972) The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagon, insulin, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, and fatty acids. *J. Biol. Chem.* 247, 3229-3235
- (37) Johnson, G.S., Mukku, V.R. (1979) Evidence in intact cells for an involvement of GTP in the activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 254, 95-100
- (38) Kahn, C.R. (1978) Insulin resistance, insulin insensitivity and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metab.* 27, 1893-1902
- (39) Kashiwagi, A., Foley, J.E. (1982) Opposite effects of a β -adrenergic agonist and a phosphodiesterase inhibitor on glucose transport in isolated human adipocytes: isoproterenol increases v_{max} and IBMX increases K_m . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 1151-1157
- (40) Kashiwagi, A., Huecksteadt, T.P., Foley, J.E. (1983) The regulation of glucose transport by cAMP stimulators via three different mechanisms in rat and human adipocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 13685-13692

- (41) Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D.L., Karlsson, F.A., Häring, H.U., Kahn, C.R. (1982) Insulin stimulation of phosphorylation of the β -subunit of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 257, 9891-9894
- (42) Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., Kahn, C.R. (1983) Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2137-2141
- (43) Kibler, R.F., Taylor, W.J., Mayers, J.D. (1964) The effects of glucagon on net splanchnic balances of glucose, amino acid nitrogen, urea, ketones, and oxygen in man. *J. Clin. Invest.* 43, 904-911
- (44) Kirsch, D., Kemmler, W., Häring, H.U. (1983) Cyclic AMP modulates insulin binding and induces post-receptor insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115, 398-405
- (45) Kirsch, D.M., Baumgarten, M., Deufel, T., Rinninger, F., Kemmler, W., Häring, H.U. (1984a) Catecholamine-induced insulin resistance of glucose transport in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 217,
- (46) Kirsch, D.M., Bachmann, W., Häring, H.U. (1984b) Ciglitazone reverses cAMP-induced post-insulin receptor resistance in rat adipocytes in vitro. *FEBS* 176, 49-54
- (47) Kirsch, D., Obermaier, B., Häring, H.U. (1985) Phorbol esters enhance basal D-glucose transport but inhibit insulin stimulation of D-glucose transport and insulin binding in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 824-832
- (48) Kono, T., Robinson, F.W., Sarver, J.A., Vega, F.V., Pointer, R.H. (1978) Actions of insulin in fat cells. *J. Biol. Chem.* 252, 2226-2233
- (49) Kono, T., Robinson, F.W., Blevins, T.L., Ezaki, O. (1982) Evidence that translocation of the glucose transport activity is the major mechanism of insulin action on glucose transport in fat cells. *J. Biol. Chem.* 257, 10942-10947
- (50) Larkins, R.G., Martin, F.I.R., Alford, F.P., Chisholm, D.J. (1978) Relationship between α and β cell function before and after metabolic control in ketotic diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 46, 131-139
- (51) Lawrence, A.M., Dorsch, T. () The glucagonoma syndrome. In: Podolsky, S., Viswanathan, M. (eds.) *Secondary diabetes: the spectrum of the diabetic syndrome*. Raven Press NY, 287-295
- (52) Leichter, S.B. (1980) Clinical and metabolic aspects of glucagonoma. *Medicine* 59 (1980) 100-113
- (53) Liljenquist, J.E. (1977) Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man. *J. Clin. Invest.* 59, 369-374
- (54) Liljenquist, J.E., Rabin, D. (1979) Lack of a role for glucagon in the disposal of an oral glucose load in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 937-939

- (55) Loten, E.G. (1978) Stimulation of a low K_M phosphodiesterase from liver by insulin and glucagon. *J. Biol. Chem.* 253, 746-757
- (56) Marliss, E.B., Proki, T.T., Unger, R.H., Soeldner, J.S. (1970) Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. *J. Clin. Invest.* 4, 2256-2270
- (57) McGarry, J.D., Wright, B.H., Foster, D.W. (1975) Hormonal control of ketogenesis. Rapid activation of hepatic ketogenic capacity rats leg antiinsulin serum and glucagon. *J. Clin. Invest.* 55, 1202-1209
- (58) Müller, W.A., Faloona, G.R., Unger, R.H. (1973) Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. *Am. J. Med.* 54, 52-57
- (59) Murad, F., Vaughan, M. (1969) Effect of glucagon on rat heart adenylyl cyclase. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1053-1059
- (60) Olefsky, J.M. (1975) Effect of dexamethasone in insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J. Clin. Invest.* 56, 1499-1508
- (61) Olefsky, J.M. (1978) Mechanisms of the ability of insulin to activate the glucose transport system in rat adipocytes. *Biochem. J.* 172, 137-145
- (62) Pessin, J.E., Gitomer, W., Oka, Y., Oppenheimer, C.L., Czech, M.P. (1983) β -adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 7286-7394
- (63) Petruzelli, L.M., Ganguly, S., Smith, C.R., Cobb, M.H., Rubin, C.S., Rosen, O. (1982) Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3 TB-L1 adipocytes and human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6792-6796
- (64) Popp, D., Shah, S., Cryer, P. (1982) The role of epinephrine-mediated β -adrenergic mechanisms in hypoglycemic glucose counterregulation and posthypoglycemic hyperglycemia in insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 69, 315-326
- (65) Raskin, P., Pietrie, A., Unger, R.H. (1979) Changes in glucagon levels after 4-5 weeks of glucose regulation by portable insulin infusion pumps. *Diabetes* 28, 1033-1035
- (66) Rizza, R., Verdonk, C., Miles, J., Service, F.J., Gerich, J.: Effect of intermittent endogenous hyperglucagonemia on glucose homeostasis in normal and diabetic man. *J. Clin. Invest.* 63, 1119-1123
- (67) Rodbell, M. (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effect of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, 375-380
- (68) Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Sundby, F. (1971) The reaction of glucagon with its receptor: evidence for discrete regions of activity and binding in the glucagon molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 900-913

- (69) Rodbell, M. (1978) The role of nucleotide regulatory components in the coupling of hormone receptors and adenylate cyclase. In: Folco, G., Paoletti, R. (eds.) *Molecular biology and pharmacology of cyclic nucleotides*. Elsevier Biomedical, Amsterdam Oxford New York 1978, S. 1
- (70) Rojas, F.J., Birnbaumer, L. (1985) Regulation of glucagon receptor binding. *J. Biol. Chem.* 260, 7829-7835
- (71) Schönle, E., Zapf, J., Frösch, E.R. (1981) In vivo control of insulin-sensitive phosphodiesterase in rat adipocytes by growth hormone and its parallelism to glucose transport. *Endocrinology* 109, 561-566
- (72) Schönle, E., Zapf, J., Fröschl, R. (1983) Regulation of rat adipocyte glucose transport by growth hormone: no mediation by insulin-like growth factors. *Endocrinology* 112, 384-389
- (73) Schwabe, U., Ebert, R., Erbler, H.C. (1975) Adenosine release from fat cells: effects on cyclic AMP levels and hormone action. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 569-584
- (74) Schwabe, U., Schönhöfer, P.S., Ebert, R. (1974) Facilitation by adenosine of the action of insulin on the accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate, lipolysis, and glucose oxidation in isolated fat cells. *Eur. J. Biochem.* 46, 537-545
- (75) Seamon, B., Daly, J.W. (1981) Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 7, 201-224
- (76) Seino, Y., Ikeda, M., Kurabachi, H. (1978) Failure to suppress plasma glucagon concentrations by orally administered glucose in diabetic patients after treatment. *Diabetes* 27, 1145-1158
- (77) Shamoon, H. (1981) Synergistic interactions among antiinsulin hormones in the pathogenesis of stress hyperglycemia in humans. *J. Clin. End. Met.* 52, 1235-1241
- (78) Sherwin, R.S., Fisher, M., Hendler, R., Felig, P. (1976) Glucagon and glucose regulation in normal, obese and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 294, 455-461
- (79) Shrago, E., Lardy, H.A., Nordlie, R.C., Foster, D.O. (1963) Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. *J. Biol. Chem.* 238, 3188-3192
- (80) Siegel, J., Olefsky, J.M. (1980) Role of intracellular energy in insulin's ability to activate adipocyte 3-O-methylglucose transport by rat adipocytes. *Biochemistry* 19, 2183-2190
- (81) Smith, U., Kuroda, M., Simpson, I.A. (1984) Counter-regulation of insulin-stimulated glucose transport by catecholamines in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.* 259, 8758-8763
- (82) Sokal, J.E., Ezdinli, E.Z. (1967) Basal plasma glucagon levels of man. *J. Clin. Invest.* 46, 778-782
- (83) Somogyi, M. (1959) Exacerbation of diabetes by excess insulin action. *Am. J. Med.* 26, 169-191

- (84) Sonne, O., Gliemann, J. (1977) Receptor binding of glucagon and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in isolated rat fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 499, 259-272
- (85) Sutherland, E.W., Oye, I., Butcher, R.W. (1965) The action of epinephrine and the role of the adenylycyclase system in hormone action. *Rec. Progr. Hormone Res.* 21, 623-646
- (86) Sutherland, E.W., Robinson, G.A. (1969) The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism. *Diabetes* 18, 797-819
- (87) Takayama, S., White, M.F., Lauris, V., Kahn, C.R. (1984) Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7797-7801
- (88) Taylor, W.M., Halperin, M.L. (1979) Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 178, 381-389
- (89) Torres, H.N., Flawi'a, M.M., Hernaez, L., Cuatrecasas, P. (1978) Effects of insulin on the adenylyl cyclase activity of isolated fat cell membranes. *J. Membr. Biol.* 43/1, 1-18
- (90) Unger, R.H. (1978) Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of controversy. *Met. Clin. Exp.* 27, 1691-1709
- (91) Unger, R.H., Orci, L. (1981) Glucagon and the A cell. *Physiology and pathophysiology.* *N. Engl. J. Med.* 304, 1518-154
- (92) Vidnes, J., Oyasaeter, S. (1977) Glucagon deficiency causing severe neonatal hypoglycemia in a patient with normal insulin secretion. *Pediatr. Res.* 11, 943-949
- (93) Whitesell, R.R., Gliemann, J. (1979) Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 254, 527-5283



Lebenslauf

13. August 1956 geboren in Bad Aibling als Sohn von Heinrich Thüringer und Christina Thüringer geb. Welker
- 1962 - 1966 Besuch der Volksschule in Bad Aibling
- 1966 - 1975 Besuch des Finsterwalder-Gymnasium in Rosenheim
- 1975 - 1980 Abgeschlossenes Studium der Ökotrophologie an der TU München
Titel der Diplomarbeit: "Diät bei Hyperlipidämie und Versuch einer Kostenberechnung" (Betreuer Prof. Wolfräm)
- November 1980 Beginn des Medizinstudiums an der Ruhr-Universität Bochum
- Mai 1981 Wechsel an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
- Mai 1982 Wechsel an die Ludwig-Maxilian-Universität München
- März 1983 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Kemmler und Dr. D. Kirsch am Institut für Diabetesforschung, München (Leitung: Prof. Dr. H. Mehner, Prof. Dr. O. Wieland)
- Mai 1986 Abschluß des Medizinstudiums mit Bestehen des 3. Staatsexamens und Erhalt der Approbation







